

## بررسی اثر آگونیستیک پاپورین برفریند گلایکه شدن آلبومین سرم انسانی

علی رضا احمدزاده\*<sup>۱</sup>، محمد فیضی<sup>۲</sup>، مهران حبیبی رضایی<sup>۱</sup>

(۱) گروه سلولی مولکولی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران

(۲) گروه محیط زیست، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه شهید چمران

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۳

تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۲۵

### چکیده

**مقدمه:** گلایکه شدن یک واکنش غیر آنزیمی است که با واکنش قند با گروه های آمین پروتئین شروع می شود. در مرحله اولیه گلایکه شدن سنتز ترکیبات حد واسط آمادوری رخ می دهد. و در مرحله پایانی پس از یک سلسله واکنش های پیچیده و برگشت ناپذیر محصولات پیشرفته گلایکه شدن (AGE) ایجاد می گردد. گلایکه شدن اختلالات مرتبط با دیابت، پیری فیزیولوژیک و آلزایمر را تحت تاثیر قرار می دهد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه آلبومین سرم انسان همراه با گلوکز و در حضور غلظت های مختلف پاپورین به مدت ۴۲ روز در دمای °C ۳۷ تیمار شد. هم چنین HSA به تنهایی به عنوان نمونه کنترل و در نمونه دیگر همراه با گلوکز به عنوان نمونه گلایکه تحت همان شرایط نگهداری شد. سپس نمونه ها با دو رنگ نمایی دورانی، فلورسانس و اسپکتروسکوپی فرابنفش بررسی شد.

**یافته های پژوهش:** گلایکه شدن آلبومین سرم با افزایش غلظت پاپورین بیشتر می شود. نمونه های دارای پاپورین تغییرات بیشتری در ساختار دوم، فلورسانس وابسته به محصولات AGE و تعداد لیزین آزاد نسبت به نمونه گلایکه و کنترل نشان می دهند.

**بحث و نتیجه گیری:** در گلایکه ماریچ آلفا و صفحات بتا به ترتیب ۵/۷ درصد کاهش و ۳/۱ درصد افزایش نسبت به کنترل نشان می دهد. گلایکه ۱۴/۲ درصد فلورسانس بیشتر نسبت به کنترل نشان می دهد. تعداد لیزین آزاد برای گلایکه ۸ درصد نسبت به کنترل کاهش نشان می دهد. در نمونه های دارای پاپورین تمامی این موارد بیشتر تغییر می کند. تغییر جذب آلبومین در حضور پاپورین نشان می دهد که پاپورین سبب شده لیزین های بیشتری با قند تماس پیدا کنند و گلایکه شدن افزایش یابد.

**واژه های کلیدی:** گلایکه شدن، آلبومین سرم انسانی، پاپورین

\*نویسنده مسئول: گروه سلولی مولکولی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران

**Email:** aahmadzadeh20@yahoo.com

## مقدمه

ایجاد ساختار های آمیلوئیدی دارند که در آرایمر هم دیده می شود، (۹،۱۰،۱۱). به خاطر واکنش قند با گروه آمین، بنابراین گلائیگه شدن با کاهش آمین آزاد در پروتئین همراه است. آلبومین سرم انسانی از جمله پروتئین هایی است که در معرض گلائیگه شدن قرار دارد. گلوکز به طور عمده به گروه آمین لیزین های ۵۲۵ و ۱۹۹،۲۸۱،۴۳۹ در آلبومین سرم انسانی متصل می شود، (۱۲). پاپاورین یکی از آلکالوئیدهای تریاک است که از آن در درمان گرفتگی های رگی به ویژه رگ های قلب و مغز هم چنین در درمان ناتوانی جنسی استفاده می شود. علاوه بر این پاپاورین سبب مهار آنزیم فسفو دی استراز و کاهش فعالیت پمپ سدیم-پتاسیم می شود، (۱۳). در این مطالعه ما به دنبال یافتن شواهدی مبنی بر نقش مثبت پاپاورین بر افزایش گلائیگه شدن آلبومین سرم بودیم. در زمینه مطالعه عوامل افزایش دهنده گلائیگه شدن مطالعات محدودی صورت گرفته و عوامل کمی مثل فسفات و گرما در این زمینه شناخته شده که با باز کردن ساختار پروتئین و افزایش تعداد لیزین های در تماس با قند سبب افزایش واکنش گلائیگه شدن می شوند. (۱۴،۱۵)

## مواد و روش ها

آلبومین سرم انسانی و سدیم بیسینکونیک اسیداز شرکت سیگما خریداری شد. فیلتر (۰/۲ میکرومتر)، کیسه دیالیز (10000MW)، تری نیترو بنزن سولفونیک اسید (TNBS)، گلوکز، بافر فسفات، سدیم آزید و پاپاورین از شرکت مرک خریداری شد. همه محلول ها با آب دیونیزه تهیه شدند. برای آماده سازی نمونه ها آلبومین سرم انسانی ۱۰ میلی گرم در یک میلی لیتر (کل مقدار آلبومین بدن ۳۰ گرم در ۵ لیتر خون می باشد با توجه به قیمت بالای آلبومین از حداقل مقدار استفاده شده است) در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (شامل آزید سدیم ۱ میلی مولار برای جلوگیری از رشد قارچ) و در حضور گلوکز ۴۰ میلی مولار (زمان گلائیگه شدن دارای ارتباط مستقیمی با غلظت قند می باشد برای داشتن زمان کوتاه تر از این غلظت استفاده شده در یک فرد دیابتی این رخداد با توجه به غلظت قند خونس در زمان بیشتری اتفاق می افتد) و غلظت های (25, 100, 250, 500 μM)

پروتئین ها در بدن ممکن است به صورت گلیکوپروتئین تولید شوند مانند ایمنوگلوبولین ها. وجود قند در ساختار این گلیکوپروتئین ها برای فعالیت آن ها ضروری است، (۱،۲). اضافه شدن قند به این گلیکوپروتئین ها به شکل آنزیمی است به این معنا که آنزیم به اسید آمین های سرین، ترئونین و یا اسپارژین در آن ها قند اضافه می کند که این فرایند گلیکوزیلاسیون نام دارد. اما در شرایط بیماری مانند دیابت که قند خون بالا است قند به شکل غیر آنزیمی با گروه E- آمین اسید آمینه لیزین و گروه α- آمین در انتهای N- ترمینال پروتئین واکنش می دهد که این فرایند گلائیگه شدن نام دارد. این واکنش در سال ۱۹۱۲ برای اولین بار توسط لوئیس میلارد کشف شد بنابراین به آن واکنش می-لارد هم گفته می شود (۱،۲،۳،۴). واکنش گلائیگه شدن به دو مرحله تقسیم می شود: در مرحله اول قندهای احیا کننده مانند گلوکز با گروه های آمین آزاد در پروتئین واکنش داده سپس پیوند شیف باز تشکیل می دهند. این پیوند پایدار نیست و تشکیل آن برگشت پذیر است. در نتیجه نوآرایی ترکیبات حد واسط آمادوری تولید می شوند. در مراحل نهایی گلائیگه شدن محصولات آمادوری به شکل آهسته و برگشت ناپذیر طی یک سلسله واکنش های پیچیده محصولات نهایی گلائیگه شدن یا AGE را ایجاد می کنند، (۴،۵،۶). محصولات نهایی گلائیگه شدن شامل ترکیبات متنوعی می باشند با وجود این دارای ویژگی های مشترکی نیز می باشند. این ترکیبات برای بدن سمی بوده و به پروتئولیز مقاوم و دارای عمر طولانی هستند، (۶،۷). هم چنین این محصولات دارای خاصیت فلورسانس بوده که از این ویژگی برای شناسایی آن ها استفاده می شود، (۶،۷،۸). ساختار دوم پروتئین ها در اثر گلائیگه شدن به شدت تغییر می کند میزان این تغییرات متناسب با میزان گلائیگه شدن پروتئین ها می باشد. در بیشتر پروتئین ها پس از گلائیگه شدن میزان ماریچج آلفا کاهش و میزان صفحات بتا در پروتئین افزایش می یابد. با توجه به هیدروفوب بودن صفحات بتا لذا محصولات نهایی گلائیگه شدن تمایل به کنار هم قرار گرفتن و

که نتیجه واکنش TNBS با گروه آمین آزاد است با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد، (۱۶). با توجه به جذب نمونه کنترل که تمام آمین های آزاد مربوط به لیزین در آن با TNBS واکنش می دهد و با توجه به این که آلومین سرم دارای ۵۸ گروه آمین مربوط به لیزین است و بر اساس جذب دیگر نمونه ها با یک تناسب میزان گروه های آمین آزاد در نمونه های دیگر محاسبه شده است. هم چنین با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر اثر غلظت های (25, 100, 250, 500 μM) به تنهایی بر آلومین سرم (۱ میلی گرم در یک میلی لیتر) در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار در طول موج ۲۰۰ تا ۵۰۰ نانومتری مطالعه شد. هم چنین اثر پاپاورین بر روی آلومین با دو رنگ نمایی دورانی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج موجود در این مقاله با برنامه (Excel) برای تحلیل بیشتر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

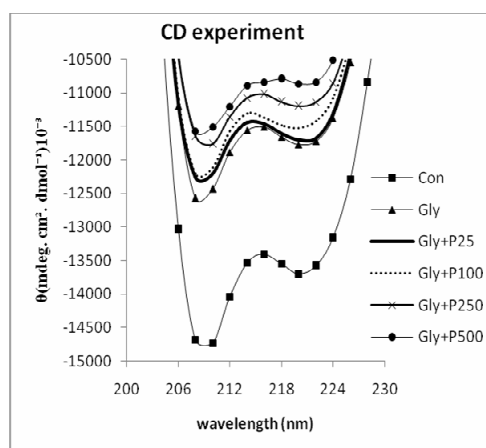
#### یافته های پژوهش

بررسی اسپکترم دو رنگ نمایی دورانی شکل ۱ حضور دو کمینه منفی در ۲۰۸ و ۲۲۱ نانومتری را در نمونه کنترل نشان می دهد که نشان دهنده ماریچ آلفا است برای نمونه گلاایکه این کمینه های منفی کاهش نشان می دهد که نشان دهنده کاهش ماریچ آلفا و افزایش صفحات بتا می باشد. در نمونه هایی که علاوه بر گلوکز، پاپاورین نیز حضور دارد شدت این کمینه ها منفی بیشتر کاهش می یابد. در نتیجه میزان ماریچ آلفا بیشتر کاهش می یابد. جدول شماره ۱ میزان ماریچ آلفا و صفحات بتا نمونه های مختلف به دست آمده از دستگاه دو رنگ نمایی دورانی را نشان می دهد. همان طور که در جدول ۱ دیده می شود ماریچ آلفا برای نمونه گلاایکه به اندازه ۵/۷ درصد نسبت به کنترل کاهش نشان می دهد. در عوض در نمونه گلاایکه صفحات بتا ۳/۱ درصد نسبت به کنترل افزایش می یابد. در نمونه هایی که پاپاورین حضور دارد این تغییرات بیشتر است.

پاپاورین برای ۴۲ روز (حداقل زمان لازم برای رخداد گلاایکه شدن) در ویال و در دمای ۳۷°C نگهداری شدند. هم چنین همان مقدار آلومین سرم انسانی بدون هیچ افزودنی به عنوان کنترل و در نمونه دیگری همراه با گلوکز ۴۰ میلی مولار به عنوان نمونه گلاایکه تحت همان شرایط نگه داری شد. پس از ۴۲ روز نمونه ها در بافر فسفات سرد دیالیز و در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند. سپس نمونه ها با کمک تست بیسینکونیک اسید تعیین غلظت شدند (این روش بر پایه توانایی این ماده در تشکیل کمپلکس با پیوند پپتیدی است که یک محصول بنفش رنگ را تولید می کند که در ۵۶۲ نانومتر حداکثر جذب را دارد. برای غلظت های مشخصی پروتئین جذب در حضور این ماده را اندازه می گیرند و جذب نمونه مجهول در حضور این ماده را هم اندازه می گیرند و با تناسب غلظت مجهول را حساب می کنند برای آگاهی بیشتر به (۱۶) رجوع شود). با توجه به کاهش ماریچ آلفا و افزایش صفحات بتا به دنبال گلاایکه شدن از دو رنگ نمایی دورانی (CD) برای اندازه گیری تغییرات ساختار دوم آلومین سرم (۲/۰ میلی گرم در یک میلی لیتر) با استفاده از دستگاه Aviv-215 و در طول موج ۱۹۰-۲۶۰ نانومتری استفاده شد. سپس مقادیر ساختار دوم نمونه ها با نرم افزار cdnn محاسبه گردید، (۱۶). با توجه به ایجاد خاصیت فلورسانس در نتیجه تشکیل محصولات نهایی گلاایکه شدن ایجاد فلورسانس در همه نمونه ها (۱ میلی گرم در یک میلی لیتر) با دستگاه فلورسانس Cary Eclipse در طول موج تحریکی-نشری (۳۸۰/۳۹۰-۵۴۰) نانومتر اندازه گیری شد، (۱۶). گلاایکه شدن کاهش گروه های آمین مربوط به لیزین آزاد را به همراه دارد. برای تعیین گروه های آمین مربوط به ریشه های لیزین بی کربنات هیدروژن سدیم و TNBS ۱/ درصد (وزنی حجمی) و ۱۰ درصد سدیم دودوسیل سولفات و اسید کلریدریک ۱ نرمال به نمونه های (۱/۰ میلی گرم در یک میلی لیتر) اضافه شد و بعد از یک ساعت جذب نمونه ها در ۳۳۵ نانومتری

جدول شماره ۱. میزان آلفا هلیکس و صفحات بتا نمونه ها (به شکل ارجوع کنید).

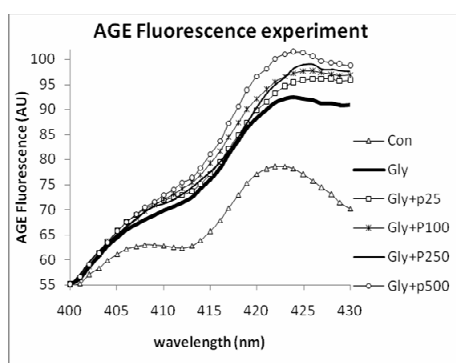
Samples	$\alpha$ Helix%	$\beta$ sheet%
Con	۴۳.۶	۱۱.۷
Gly	۳۷.۹	۱۴.۸
Gly+P25	۳۶.۴	۱۵.۷
Gly+P100	۳۶.۲	۱۵.۹
Gly+P250	۳۵.۴	۱۶.۲
Gly+P500	۳۵.۱	۱۶.۶



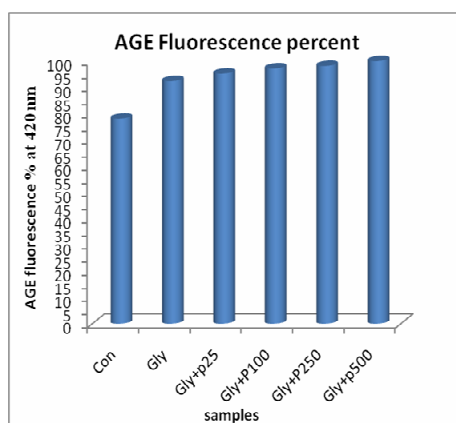
شکل شماره ۱. اسپکتروم دو رنگ نمایشی دورانی نمونه ها در بافر فسفات pH 7.4, 50 mM  
 Con (کنترل), Gly (گلیکته), Gly + P25 (آلبومین + گلوکز + پاپورین 25  $\mu$ M)  
 Gly + P100 (آلبومین + گلوکز + پاپورین 100  $\mu$ M), Gly + P250 (آلبومین +  
 گلوکز + پاپورین 250  $\mu$ M), Gly + P500 (آلبومین + گلوکز + پاپورین 500  $\mu$ M)

فلورسانس نسبت به نمونه گلیکته بیشتر افزایش نشان می دهد. همان طور که در شکل شماره ۳ دیده می شود نمونه گلیکته ۱۴/۲ درصد نسبت به کنترل افزایش فلورسانس دارد در نمونه هایی که پاپورین حضور دارد فلورسانس بیشتر افزایش می یابد.

شکل شماره ۲ میزان تولید فلورسانس وابسته به محصولات نهایی گلیکته شدن را نشان می دهد. گلیکته شدن شدت فلورسانس وابسته به محصولات نهایی گلیکته شدن را زیاد می کند در نمونه هایی که علاوه بر گلوکز، پاپورین هم حضور دارد شدت



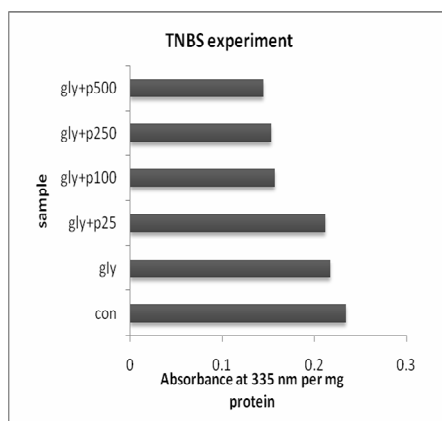
شکل شماره ۲. میزان فلورسانس وابسته به محصولات نهایی گلايکه شدن نمونه ها (به شکل ۱ رجوع کنید).



شکل شماره ۳. درصد فلورسانس نمونه ها که ماکزیمم آن در ۴۲۰ نانومتر است (به شکل ۱ مراجعه شود)

دارد میزان جذب نمونه های همراه با پاپاورین نسبت به نمونه گلايکه کاهش بیشتر دارد. جدول ۲ هم میزان آمین آزاد مربوط به لیزین نمونه ها را نشان می دهد. همان طور که در شکل شماره ۵ دیده می شود تعداد گروه آمین مربوط به لیزین در نمونه گلايکه ۸ درصد نسبت به کنترل کاهش نشان می دهد. در نمونه های همراه با پاپاورین این کاهش بیشتر است.

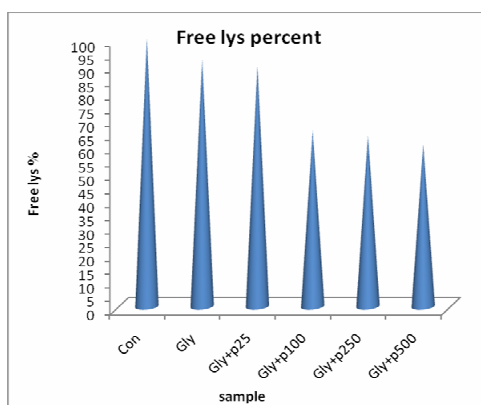
شکل شماره ۴ جذب نمونه ها در ۳۳۵ نانومتری در حضور TNBS را نشان می دهد همان طور که دیده می شود نمونه کنترل بیشترین جذب را دارد چون تمام گروه های آمین مربوط به لیزین در آن آزاد می باشد لذا TNBS با همه آن ها واکنش داده است. با واکنش قند با گروه های آمین مربوط به لیزین TNBS دیگر نمی تواند با گروه آمین آزاد واکنش دهد لذا جذب در ۳۳۵ نانومتری نمونه گلايکه نسبت به کنترل کاهش



شکل شماره ۴. میزان جذب در ۳۳۵ نانومتری نمونه‌ها (به شکل ۱ رجوع کنید).

جدول شماره ۲. تعداد گروه آمین آزاد مربوط به ریشه لیزین (به شکل ۱ رجوع کنید).

samples	Number free lys
Con	۵۸
Gly	۵۳
Gly+P25 $\mu$ M	۵۲
Gly+P100 $\mu$ M	۳۸
Gly+P250 $\mu$ M	۳۷
Gly+P500 $\mu$ M	۳۵



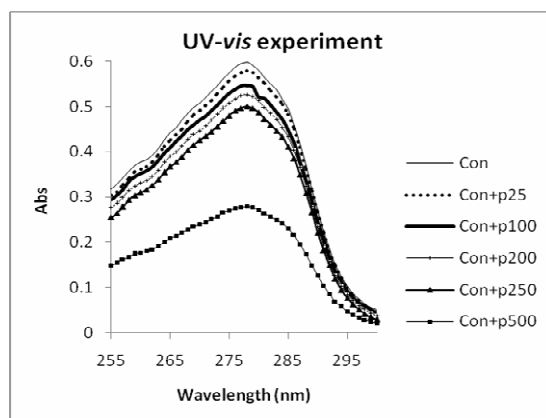
شکل شماره ۵. درصد گروه آمین آزاد مربوط به ریشه لیزین نمونه‌ها (به شکل ۱ رجوع کنید)

است. جذب در این طول موج نتیجه حضور اسید آمینه اروماتیک به ویژه تریتوفان می باشد و تغییر در جذب ۲۸۰ نانومتر نشان دهنده تغییر در موقعیت این اسید آمینه می باشد (در بررسی تغییر جذب آلبومین در حضور

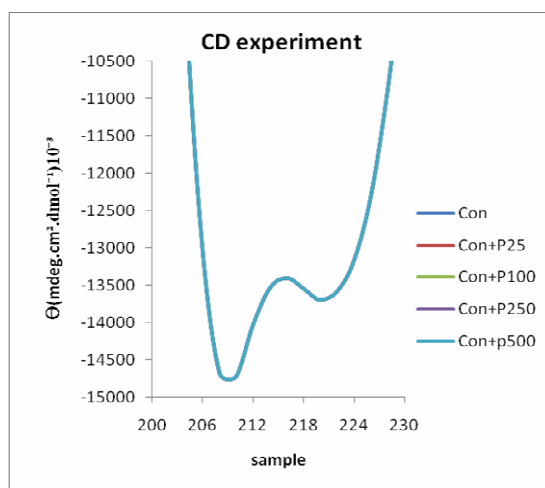
شکل شماره ۶ اثر غلظت های مختلف پاپورین به تنهایی بر آلبومین سرم انسانی را نشان می دهد. این شکل نشان می دهد که پاپورین جذب در ۲۸۰ نانومتری آلبومین را با افزایش غلظت خود کم کرده

ذکر این نکته لازم است که آلبومین پروتئینی محلول، مونومریک و دارای سه دومین و ۵۸۵ اسید آمینه می باشد. برای درک بیشتر شکل شماره ۸ ساختار آلبومین (۱۲) و شکل شماره ۹ ساختار پاپورین را نشان می دهد. (۱۷)

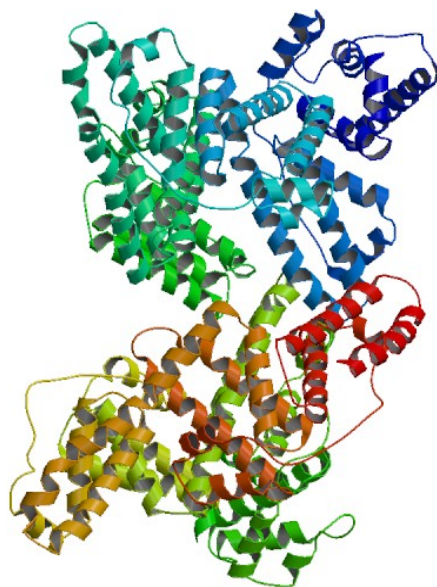
پاپورین برای حذف جذب پاپورین دستگاه را با آن بلانک کردیم. شکل شماره ۷ طیف دو رنگ نمایی آلبومین در حضور پاپورین را نشان می دهد. این شکل نشان می دهد غلظت های مختلف پاپورین در میزان آلفا هلیکس و صفحات بتا (که از اجزا ساختار دوم اند) نسبت به کنترل تغییری ایجاد نکرده است.



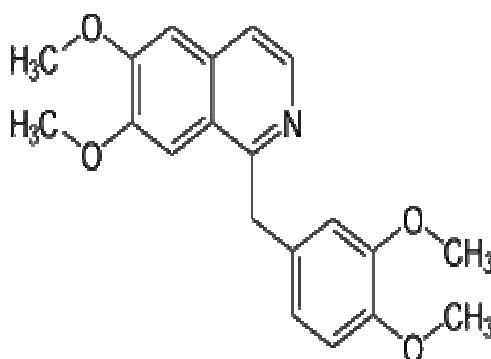
شکل شماره ۶. تاثیر غلظت های مختلف پاپورین بر جذب  $280$  نانومتری آلبومین سرم  
 Con (کنترل), Con +P25 (آلبومین + پاپورین  $25 \mu\text{M}$ ), Con +P100 (آلبومین  
 + پاپورین  $100 \mu\text{M}$ ), Con +P200 (آلبومین + پاپورین  $200 \mu\text{M}$ ),  
 Con +P250 (آلبومین + پاپورین  $250 \mu\text{M}$ ), Con +P500 (آلبومین + پاپورین  $500 \mu\text{M}$ )



شکل شماره ۷. طیف دو رنگ نمایی آلبومین در حضور غلظت های مختلف پاپورین (به شکل ۶ رجوع کنید)



شکل شماره ۸. ساختار البومین سرم انسانی (۱۲)



شکل شماره ۹. ساختار شیمیایی ماده پاپورین (۱۷)

### بحث و نتیجه گیری

۲۲۱ نانومتری که نشانگر ماریچج آلفا است در نمونه گلیکته نسبت به نمونه کنترل کاهش نشان می دهد برای دیگر نمونه ها که پاپورین حضور دارد میزان کاهش نسبت به نمونه گلیکته بیشتر است. محاسبه میزان ماریچج آلفا و صفحات بتا با نرم افزار cdnn (از روی گراف های دو رنگ نمایی دورانی) و جدول شماره ۱ هم این مطلب را تأیید می کند که با افزایش غلظت پاپورین گلیکته شدن بیشتر اتفاق می افتد به طوری که در نمونه گلیکته فقط ۳/۱ درصد نسبت به کنترل

مهم ترین هدف این مقاله به دست آوردن شواهدی برای اثبات اثر آگونیستیک پاپورین بر فرایند گلیکته شدن آلبومین سرم انسانی بود که این شواهد با مطالعات دو رنگ نمایی دورانی، فلورسانس وابسته به تولید محصولات نهایی گلیکته شدن، بررسی میزان آمین آزد مربوط به لیزین و طیف سنجی فرا بنفش حاصل شد. گلیکته شدن با کاهش میزان ماریچج آلفا و افزایش صفحات بتا همراه است، (۹،۱۰،۱۱). همان طور که در شکل شماره ۱ دیده می شود کمینه های ۲۰۸ و



صفحات بتا افزایش نشان می دهد اما در نمونه دارای پاپاورین ۵۰۰ ماکرومولار این میزان به ۴/۹ درصد نسبت به کنترل می رسد هم چنین در گلايکه ماریچج آلفا ۵/۷ درصد نسبت به کنترل کاهش دارد اما در نمونه دارای پاپاورین ۵۰۰ ماکرومولار این کاهش به ۸/۵ درصد نسبت به کنترل می رسد. به دنبال گلايکه شدن تولید محصولات نهایی گلايکه شدن اتفاق می افتد که دارای خاصیت فلورسانس می باشد، (۶،۷،۸). همانطور که در شکل شماره ۲ دیده می شود میزان فلورسانس برای نمونه گلايکه نسبت به نمونه کنترل افزایش دارد و برای نمونه هایی که پاپاورین حضور دارد با افزایش غلظت پاپاورین میزان فلورسانس بیشتر نسبت به نمونه گلايکه افزایش نشان می دهد به طوری که نمونه دارای پاپاورین ۵۰۰ ماکرومولار دارای بیشترین فلورسانس می باشد که ماکزیمم آن در طول موج ۴۲۰ نانومتري می باشد (شکل شماره ۳ را ببینید). به خاطر واکنش قند با گروه های آمین میزان آمین آزاد در پروتئین کاهش می یابد، (۱۲). با کاهش آمین آزاد TNBS نمی تواند با گروه آمین واکنش دهد لذا جذب در ۳۳۵ نانومتري کاهش می یابد. همان طور که در شکل شماره ۴ و جدول شماره ۲ و شکل شماره ۵ دیده می شود در نمونه گلايکه نسبت به نمونه کنترل میزان آمین آزاد کاهش دارد. برای نمونه هایی که پاپاورین حضور دارد با افزایش غلظت پاپاورین میزان آمین آزاد نسبت به نمونه گلايکه بیشتر کاهش می یابد برای نمونه گلايکه میزان آمین آزاد ۸ درصد نسبت به کنترل کاهش دارد اما در نمونه دارای پاپاورین ۵۰۰ ماکرومولار میزان آمین آزاد ۳۹/۷ درصد نسبت به کنترل کاهش نشان می دهد. جذب در ۲۸۰ نانومتر برای پروتئین ها در ارتباط با حضور اسید آمینه های تیروزین، فنیل آلانین و تریپتوفان می باشد. هر گونه تغییر در وضعیت این ریشه ها با تغییر در جذب ۲۸۰ نانومتري همراه است. شکل شماره ۶ نشان می دهد در حضور

پاپاورین وضعیت این ریشه ها در آلبومین تحت تاثیر قرار گرفته به عبارت دیگر پاپاورین به نحوی بر ساختار آلبومین اثر گذاشته است از طرفی شکل شماره ۷ نشان می دهد پاپاورین بر میزان آلفا هلیکس و صفحات بتا که از اجزا ساختمان دوم پروتئین اند اثری نداشته است. بر اساس شکل شماره ۷ می توان گفت پاپاورین ساختار دوم پروتئین (شامل آلفا هلیکس و صفحات بتا) را در آلبومین تغییر نداده است. اما با توجه به شکل شماره ۶ نیز می توان گفت تغییر در جذب ۲۸۰ نانومتري که با تغییر در وضع ریشه های اروماتیک صورت گرفته نتیجه تغییراتی است که پاپاورین بر ساختار آلبومین وارد کرده است. به عبارت دیگر پاپاورین در ساختار سوم پروتئین تغییر ایجاد کرده و باعث شده ساختار سوم پروتئین باز شود. در این که پاپاورین چگونه این تغییر را سبب شده می توان گفت همان طوری که می دانیم در شکل گیری ساختار سوم پروتئین بر همکنش های ضعیف داری اهمیت می باشند و از مهم ترین این بر همکنش ها پیوند هیدروژنی و بر همکنش هیدروفوب می باشد. همان طوری که در شکل شماره ۹ دیده می شود پاپاورین دارای گروه های متیل و حلقه های بنزی می باشد که ماهیت هیدروفوبیک دارند و از این طریق بر همکنش های هیدروفوبیک در آلبومین را تحت تاثیر قرار می دهد، (۱۷). از طرفی در ساختار پاپاورین نیتروژن و اکسیژن وجود دارد که قابلیت تشکیل پیوند هیدروژنی با آلبومین را دارند، (۱۷). در نتیجه باز شدن ساختار سوم اتفاق افتاده و لیزین های بیشتری در تماس با قند قرار گرفته و گلايکه شدن بیشتر اتفاق افتاده و در نتیجه گلايکه شدن ساختار دوم پروتئین به صورت کاهش آلفا هلیکس و افزایش صفحات بتا تغییر یافته است که در شکل شماره ۱ دیده می شود. (ذکر این نکته لازم است که جذب پاپاورین با بلاک صفر گردیده است).

## References

- 1-Rohovec J, Maschmeyer T, Peter A. The structure of the sugar residue in glycated human serum albumin and its molecular recognition. *J Chemistry* 2003; 9:2193-99.
- 2-Bijukumer G, Karmakar N, Anand S, Misra A. Auto fluorescence characterization of advanced glycation end product of hemoglobin. *J Spectrochemica Acta* 2005;61:163-70.
- 3-Schalkwijk C, Stehouwer C, Hinsbergh V. Fructose mediated non enzymatic glycation sweet coupling or bad modification. *J Diabets* 2004;20:369-82.
- 4-Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. A review advanced glycation end-products. *J Diabetologia* 2002;44:129-46.
- 5-Vigneshwaran N, Bijukumar G, Karmakar N, Anand S, Misra A. Fluorescence and biochemical characterization of glycated hemoglobin. *J Macromol Symp* 2003;193:119-27.
- 6-Kikuchi S, Shimpo K, Takeuchi M, Yamagishi S, Makita N. Glycation sweet temper for neuronal death. *J Brain Research Review* 2003;41:306-23.
- 7-Schmitt A, Gasic Milenkovic J, Schmitt J. Characterization of advanced glycation end products mass changes in Correlation to side chain modification. *J Analytical Biochemistry* 2005;10:1016-21.
- 8-Yeargans G, Seidler N. Carnosine promotes the heat denaturation of glycated protein. *J Biochem* 2003;300:75-8.
- 9- Seidler N, Seible I. Glycation of aspartat aminotransferase and conformational flexibility. *J Biochemical* 2000;277:47-50.
- 10- Seidler N, Kowalewski C. Methyl glyoxal induce glycation affects protein topography. *J Biochemistry* 2003;410: 149-54.
- 11-Stitt A, Acad Y, Ann N. The millard reaction in eye disease. *J Diabets* 2005; 1043:585-97.
- 12-Iberg N, Fluckiger R. Nonenzymatic glycosylation of albumin in vivo. *J Biological Chemistry* 1996;29:13542-45.
- 13-Asadi Karam G, Rashidinejad HR, Aghae MM, Ahmadi. Opium can differently alter blood glucose, Sodium and potassium in male and female rat. *J Pak Pharm*, 2008;21:180-4.
- 14-Gil H, Salcedo D, Romero R. Effect of phosphate buffer on the kinetics of glycation protein. *J Physical organic chemistry* 2005;10:183-6.
- 15-Norbert W, George S. Effect of thermal denaturation on protein glycation. *J life of Science* 2002;70:1789-1799.
- 16-Sattarahmady N, Khodagholi F, Moosavi Movahedi AA, Heli H, Hakimelahi GH. Alginate as an anti glycating agent for HAS. *J Biological Macromolecules* 2007;10:1017-24.
- 17-Whiteled CG, Daya S. Protein-ligand interaction 6 nicotinic acetylcholine receptor agonist activity of Isoquinoline alkaloids. *J Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter* 2001;23:2801-6.



## Agonist Effect of Papaverine on Human Serum Albumin Glycation

Ahmadzadeh A<sup>1\*</sup>, Feizie M<sup>2</sup>, Habibi Rezaie M<sup>3</sup>

(Received: 25 Aug. 2010

Accepted: 14 Feb. 2011)

### Abstract

**Introduction:** Glycation is a non enzymatic reaction initiated by the primary addition of sugar to the amino groups of proteins. In the early stage of glycation, the synthesis of intermediates leading to formation of Amadori compounds occurs. In the late stage, advanced glycation end product (AGE) is irreversibly formed after a complex cascade of reactions. Glycation also affects diabetes-related complications, physiological aging and neurodegenerative diseases such as alzheimers.

**Materials & Methods:** In this study, HSA incubation with glucose and different concentration of papaverine for 42 days at 37°C. as well as HSA incubation alone (control sample), with glucose (glycated sample) were treated respectively under the same conditions. After 42 days, the samples by use of circular dichroism, fluorescence and UV spectroscopy were investigated.

**Findings:** HSA glycation increases along with rising of papaverine concentration. Samples containing papaverine showed more changes in secondary structure, free amino groups and AGE fluorescence in relation to glycated and control samples.

**Discussion & Conclusion:** In glycated  $\alpha$  helix and  $\beta$  sheet a 5.7% decrease and 3.1% increase were seen in comparison to the control respectively. Glycated showed 14.2% fluorescence more than the control. Free lys number in glycated showed 8% less in relation to the control. All these cases showed more changes in samples which contained papaverine. HSA absorbance in presence of papaverine showed that papaverine causes more lys contact with sugar and an increase in glycation.

**Keywords:** glycation, human serum albumin, papaverine

1. Dept of Cell & Molecule, Faculty of Biology, University Tehran, Tehran, Iran

2. Dept of Environment, Faculty of Technique & Engineering, University Chamran, Tehran, Iran

3. Dept of cell & molecular, Faculty of biology, university of Tehran

\*(corresponding author)